

⑯ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A) 平2-232563

⑬ Int. Cl.

G 01 N 35/00
33/543

識別記号

府内整理番号

D 6923-2G
R 7906-2G

⑭ 公開 平成2年(1990)9月14日

審査請求、未請求、請求項の数 2 (全6頁)

⑮ 発明の名称 液体試料の分析方法およびその装置

⑯ 特願 平1-52759

⑰ 出願 平1(1989)3月7日

⑱ 発明者 高瀬 實

千葉県君津郡袖ヶ浦町上泉1660番地 出光石油化学株式会社内

⑲ 発明者 山路 一隆

東京都千代田区丸の内3丁目1番1号 出光石油化学株式会社内

⑳ 発明者 相澤 勝益男

東京都杉並区天沼2-19-14

㉑ 出願人 出光石油化学株式会社

東京都千代田区丸の内3丁目1番1号

㉒ 代理人 弁理士 久保田 藤郎

東京都千代田区丸の内3丁目1番1号

特許出願の範囲は、本発明の実用的新規性を認められ、特許権として保護される。

特許権は、本発明の実用的新規性を認められ、特許権として保護される。

特許権は、本発明の実用的新規性を認められ、特許権として保護される。

特許権は、本発明の実用的新規性を認められ、特許権として保護される。

⑲ 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野) 本発明は液体試料の分析方法とその装置に関するものである。本発明はディスク上で液体試料と反応性物質(試薬)の反応および反応生成物の性質の測定を行なうことにより、設備、操作を著しく単純化することができ、しかも高精度な測定結果が得られる分析方法とその装置に関するものである。

(従来技術および発明が解決すべき課題)

近年、例えば血液中の血清のような液体試料を種々の試薬と反応させ、その中に微量含まれるホルモン、ビタミン、新型ウイルスあるいは免疫性物質を検出し、各種疾病、特にガンやエイズなどの早期発見に資することが望まれている。しかしながら、従来の抗原抗体反応を利用した免疫性物質の測定法は紙(フィルム)に試薬を含浸させ、これに液体試料(血液、尿等)を塗布して反応させ、その色の変化から判断するドライフィルム法は簡便な測定法であるが、精度の高い分析が行なえないという欠点がある。一方、大規模で複雑な装

特許出願の範囲は、本発明の実用的新規性を認められ、特許権として保護される。

置を用いる分析方法としては、例えば特開昭61-193072号公報に記載された自動式化学装置を用いる方法があり、回転可能なディスクの半径方向に流体拘束手段を有する溝状の反応帯を形成し、この反応帯に試薬を付着させておき、該ディスクに液体試料を供給して遠心力により半径方向に移動させ、試薬と反応せしめ、反応生成物を適当なプローブで取り出してゲルにおける電気泳動のような他の処理を行ない、DNA配列決定等の必要な性質の分析を行なっている。

また、特公昭54-36879号公報には液体材料を分析するための方法および装置が示されている。この方法は回転可能なディスクの半径方向に複数のキャビティを設け、ここで液体試料と試薬を反応させ、さらに得られた反応生成物を液相分離媒体を有するクロマトカラムに移動させて分離し、このカラムを通過した反応生成物を管で受け、この管を取り外して内容物の放射線量等を測定することによって必要な性質の分析を行なっている。

東の反応を行ない、さらに得られた反応生成物の性質の測定をも行なうことが出来る装置を用いることにより、設備、操作を著しく単純化することができ、しかも高精度で測定することができるこを見い出し、この知見に基いて本発明を完成するに到った。

すなわち本発明は、回転可能なディスク上の半径方向に形成した複数の流路のうち、少なくとも1つの流路の外周部に反応性物質を固定し、前記流路の内周部に液体試料を導入し、前記ディスクを回転させ、前記液体試料を遠心力により流動せしめて前記反応性物質と反応させた後、得られた反応生成物の性質を前記ディスク上で測定することを特徴とする液体試料の分析方法を提供するとともに、(A)上面の半径方向に複数の流路が形成されているとともに、前記流路のうち少なくとも1つの流路の外周部に反応性物質が固定されているディスク、(B)前記ディスクの回転手段、(C)前記流路の内周部に液体試料を供給する手段、(D)前記ディスク上において、反応生成物の性質を測

これらの分析方法では、回転可能なディスクを用いて液体試料と試薬の反応を行なっているため、反応は効率よく行なわれているが、反応生成物の性質の測定は、反応生成物をディスクの外に取り出して別の測定手段を用いて行なっており、装置の大規模化、複雑化が不可避であり、しかも測定方法も繁雑となり、分析に長時間を要している。

また、特開昭59-193359号公報には免疫学的自動分析装置が示されており、この装置による測定方法はU字管中にサンプルを分注し、この中に抗原抗体反応を生じさせる抗原（抗体）を固定したビーズ状担体を投入して反応させ、この反応液を外に取り出して比色計などにより測定するものである。したがって、この方法による分析方法も担体の移動、洗浄、分離等複雑な機構が必要であり、その手順も非常に繁雑であるという問題があった。

〔課題を解決するための手段〕

上記の問題を解決するために、本発明者らは鋭意研究を進めた結果、ディスク上で液体試料と試

定する手段および(E)これらの制御手段からなることを特徴とする液体試料の分析装置を提供するものである。

以下、本発明を図面を参照することにより説明する。第1図は本発明を実施する場合に好適な装置の一概要を示す概略図である。

図中、符号1はディスクであり、その上面には第2図に示すように半径方向に複数の流路2が溝状に設けられている。この流路2の断面形状（半径方向断面）としては種々のものが考えられ、例えば第3図(i)~(k)に示す如き形状のものが用いられる。第3図(i)~(k)は流路2の断面形状を示すディスクの一部切欠部であり、図の左方にディスクの中心がある。第3図(i)は単純な溝状の流路を示し、第3図(j)は液体試料滴下部を有するものを示し、第3図(k)は所定間隔で深溝部を設けたものを示し、第3図(n)は第3図(k)の深溝部に段差を付けたものを示し、第3図(o)は溝状の流路の途中に凸部を設けたものを示している。これらの中でも特に第3図(k)に示す形状のものが

好ましい。

また、第2図(a)においては半径方向の流路2

として直線状の流路を示したが第2図(b)(f),(g)

に示したような折れ曲がり流路や曲線流路であつてもよい。このようにすることにより、液体試料(第一試薬)とともにラベル(標識)化した抗原(第二試薬)を流路2の内周部すなわちディスクや洗浄液の遠心力による流动(移動)が容易となる。内周に近い部分に塗布しておくことでラベル化され、流路間の液体の混合を防止できる。さらに流路2の抗原は、フルオレセイン、ロダミン類等公知の蛍光物質でラベル化したもの用いることが好ましい。これらの個々の流路2の巾と長さは特に制限はない。このようなラベル化抗原(第二試薬)を用い

ないが血清分析などには通常巾が1~1.0mmである場合の前記反応性物質3(第一試薬)としては、長さが5.0~1.0mm深さ0.1~2mmのものと、液体試料およびラベル化抗原(第二試薬)と特異的反応する抗体を用いる。

制限はないが、例えば、ポリカーボネート、アクリル等なお、反応性物質3のディスク上面の流路2内側をシリコン、ポリスチレンなどの樹脂の射出成形品が好んで用いられる。これらの方法によつて行なうことが可能であり、試料、試薬の種類に応じて裏面処理を施しておき、例えは流路2内に直接塗布したり流路したもの用いてもよい。これらの複数の流路2は、流路2内に吸着剤を被覆した後、反応性物質3を供給のうち少なくとも1つの流路の外周部、すなわち外周に近い部分に反応性物質3が固定せしめられる。ディスク外周に近い部分に反応性物質3が固定されることは、吸着せしめるなどの方法によつて行なうことである。また、外周部に近い部分に反応性物質3として、例えは免疫活性物質3はディスク1の外周部外方に設けた、ここで反応性物質3としては、例えは免疫活性物質3は排液処理手段4が設けられている。排液処理手

段4としては、例えはディスク1の外周部外方に一周状の堰を設けておき、これと適当な排液収容部とを組合せたものを用いればよい。

次に図中の符号5はディスク1の回転手段であり、公知のディスク回転装置を用いることができる。このディスクの回転手段5としては3,000rpm位迄安定して回転しうるもののが好ましい。

また、本発明においては、流路2の内周部に液体試料を供給する手段6が備えられている。

この液体試料の供給手段6は、液体試料、試薬等の必要量(μl単位)を流路の所定位置に供給できるものならばよく、通常位置制御機構付きのマイクロプローブなどが用いられる。尚且つ、本発明において、分析される液体試料としては、種々のものが挙げられるが、全血血液、血清尿、体液などの液体試料の分析に特に有効である。なお、全血血液を用いて分析を行なう場合には、ディスク1上に膜フィルター(図示せず)を設けておき、この膜フィルターを用いて血球と血清を分離し、血清を用いればよい。また、予め遠心分離

物質が用いられてこの免疫活性物質が後述する液体試料と反応する。通常、反応生成物の性質の測定を容易ならしめるため、この反応性物質3(第一試薬)とともにラベル(標識)化した抗原(第二試薬)を用いる。

抗原は、フルオレセイン、ロダミン類等公知の蛍光物質でラベル化したもの用いることが好ましい。このようにすることにより、液体試料(第一試薬)とともにラベル化抗原(第二試薬)を用いることが可能である。なお、このディスクの材質は特に制限はないが、例えはポリカーボネート、アクリル等なお、反応性物質3のディスク上面の流路2内側をシリコン、ポリスチレンなどの樹脂の射出成形品が好んで用いられる。これらの方法によつて行なうことが可能であり、試料、試薬の種類に応じて裏面処理を施しておき、例えは流路2内に直接塗布したり流路したもの用いてもよい。これらの複数の流路2は、流路2内に吸着剤を被覆した後、反応性物質3を供給のうち少なくとも1つの流路の外周部、すなわち外周に近い部分に反応性物質3が固定せしめられる。ディスク外周に近い部分に反応性物質3として、例えは免疫活性物質3はディスク1の外周部外方に設けた、ここで反応性物質3としては、例えは免疫活性物質3は排液処理手段4が設けられている。排液処理手

段4としては、例えはディスク1の外周部外方に一周状の堰を設けておき、これと適当な排液収容部とを組合せたものを用いればよい。

さらに本発明においては、ディスク1上において反応生成物の性質を測定する手段7が備えられている。この反応生成物の性質の測定手段7は公知のものを適宜用いればよい。例えは、第二試薬として蛍光物質でラベル化したラベル化抗原を用いるフルオロイムジアッセイ法を適用する場合、得られた反応生成物は蛍光分析により定量されるので、公知の蛍光分析測定装置を用いればよい。

また、比色計を用いて反応生成物を濃度変化により定量化してもよい。

この反応生成物の測定手段7は、ディスク1上の外周部に備えられるが、必要に応じて移動可能な構造としておくこともできる。尚且つ、尚且つ最後に、本発明においては上記の手段を自動化して反応から測定までの操作を迅速に、かつ精度良く行なうために制御手段8を用いる。特に、ディスク上の流路が多い場合には、精密な制御手段が必須である。このような制御手段としては前記したような操作が有機的に行なえるものであれば

特に制限はなく、公知の制御装置を適宜用いればよい。

次に、本発明の分析方法について説明すると、まず少なくとも1つの流路2の外周部に反応性物質3を固定する。ここで前記した如く、反応性物質3(第一試薬)とともに、ラベル化抗原(第二試薬)を用いることにより反応生成物の測定を容易ならしめることができる。したがって、このラベル化抗原を流路2の内周部に塗布しておくことが好ましい。このラベル化抗原としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質などによりラベル化されたものが用いられる。

一方、流路2の内周部に液体試料を、液体試料供給手段6を用いて供給する。上記ラベル化抗原(第二試薬)を用いる場合には、液体試料を該ラベル化抗原の塗布されている箇所より内周に供給する。次いでディスク1を、ディスク回転手段5を用いて回転させ、液体試料を遠心力によって流動せしめて、ラベル化抗原を塗布している場合はこのラベル化抗原と溶解混合する。十分に混合し

たならば、ディスク1の回転数を上げ、この溶解混合物をディスク1の外周部へ移動させてこの外周部に固定されている反応性物質3(固定化抗体)と抗原-抗体反応を行なう。

血液、尿あるいは体液中の微量成分の定量に適した免疫分析法は特定の抗原と抗体との間に起こる抗原-抗体反応を用いたもので、通常抗原標識として放射性同位元素、酵素、蛍光物質などを用いるが、反応による濃度変化を光学的に読み取り定量する方法もある。

上記の如く反応させた後、必要により洗浄液を流し未反応物などを含む反応液の一郎をディスク外周部外方に設けられている排液手段4を用いて排除する。具体的にはディスク1の回転数をさらに上げ、不要な液を堰を越えさせ排液収容部に送り込めばよい。

次いで、残留した反応生成物についてディスク1上において、必要とする性質を測定手段7を用いて測定する。例えば蛍光物質でラベル化したラベル化抗原を用いた場合、残留した反応生成物の

蛍光光度を測定して液体試料の抗原量を算出することができる。

また、上記のラベル化抗原を用いない場合は、比色計の如き測定手段を用いて反応による濃度変化により定量化すればよい。

もし、上記液体試料が抗体を含むものであるならば、前述のラベル化抗原(第二試薬)をラベル化抗体とし、固定化抗体(第一試薬)を固定化抗原とすることによって測定することが可能である。

(実施例)

次に、本発明を実施例により詳しく説明する。

実施例1

第1図に示す如き分析装置を用いて液体試料の分析を行なった。

この分析装置におけるディスク1は直径200mm、厚さ2mmのポリカーボネート製のものであり、その上面に第3図(1)に示す如き流路2(溝の深さ1.0mm、溝の長さ80mm)を円周上等間隔に18本有するものを用いた。

この反応の模式図を第4図に示す。

まず、ロダミンBにより蛍光標識化した癌胎児性抗原(CEA)を流路2の内周部(以下、ゾーンIという。)に塗布し、また流路2の外周部(以下、ゾーンIIという。)に反応性物質3(液体試料の抗原および前記標識化抗原と特異的に反応する抗体を物理的吸着法により流路に固定した。

まず、ゾーンIの最内側に、液体試料として血清0.2ml(10%水溶液)を滴下し、ディスク1を回転させ、血清とゾーンIに塗布されている蛍光標識化抗原と溶解混合した。次いで、ディスクの回転数を上げゾーンIの溶解混合物をゾーンIIへ移動し、ゾーンIIでは流路上に固定化した反応性物質3と混合され抗原-抗体反応が行なわれた。反応終了後、ゾーンIに洗浄液(純水)を導入し、再びディスクを回転させ、ゾーンIおよびゾーンIIを洗浄し、未反応抗原を流出した。その後、ゾーンIIに残留した、抗体と反応した抗原を蛍光光度計により定量し、CEAが $50 \times 10^{-8} / ml$ 血清であることが測定された。

(発明の効果)

本発明の方法によれば、ディスク上で液体試料と試薬の反応および反応後の測定まで行なうため、操作性にすぐれ、しかも精度が良いので、少量の試料で十分であり、自動化、連続化が容易である。

また、本発明の装置によれば設備を小型化することができ、しかも操作性にすぐれたものとすることができる。

さらに、ディスクの溝（流路）の形状を変えることにより種々の検査、分析ができ、溝（流路）の数を増やすことにより、多種の分析を同時に行なうことも可能である。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明による分析装置の一態様を示す概略図である。第2図は(a), (b) はディスク上の流路形状例と断面図である。第3図(i)~(k) は流路の断面形状を示すディスクの一部切欠図である。第4図は実施例における反応の模式図である。

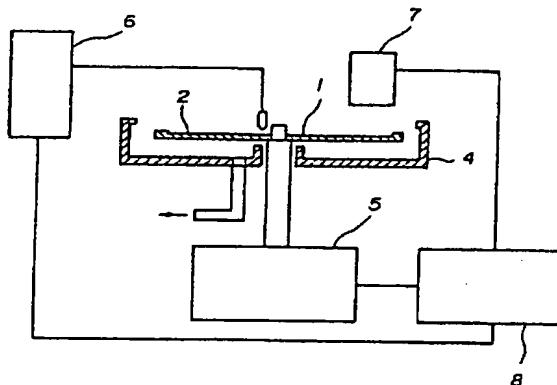
1 … ディスク、 2 … 流路、 3 … 反応性物質、
4 … 排液手段、 5 … ディスクの回転手段、
6 … 液体試料供給手段、 7 … 反応生成物の測定手段、
8 … 制御手段

特許出願人 出光石油化学株式会社

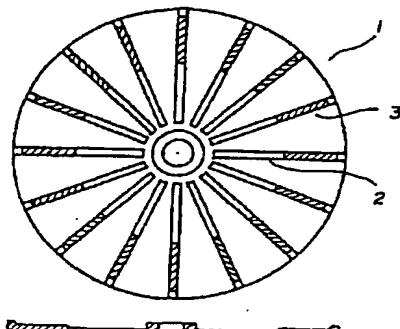
代理人 弁理士 久保田 駿郎



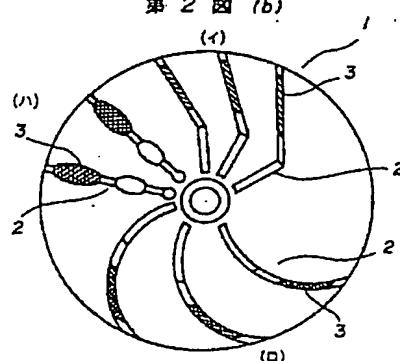
第1図



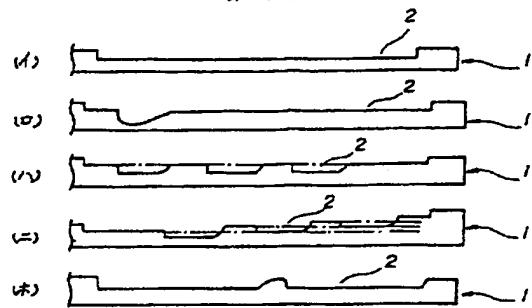
第2図 (a)



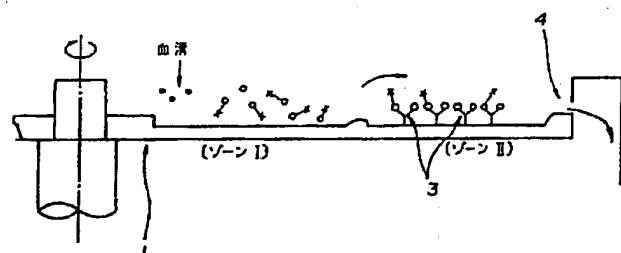
第2図 (b)



第3図



第4図



【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成5年(1993)6月29日

【公開番号】特開平2-232563

【公開日】平成2年(1990)9月14日

【年通号数】公開特許公報2-2326

【出願番号】特願平1-52759

【国際特許分類第5版】

G01N 35/00 D 8310-2J

33/543 R 7906-2J

手続補正書(自発)

平成4年5月19日

特許庁長官 深沢亘殿

1. 事件の表示

特願平1-52759

2. 発明の名称

液体試料の分析方法およびその装置

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

出光石油化学株式会社

4. 代理人

④104

東京都中央区京橋1丁目1番10号

西勘ビル5階

(7407)弁理士 久保田藤郎

電話(3275)0721番

5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄および図面

6. 補正の内容

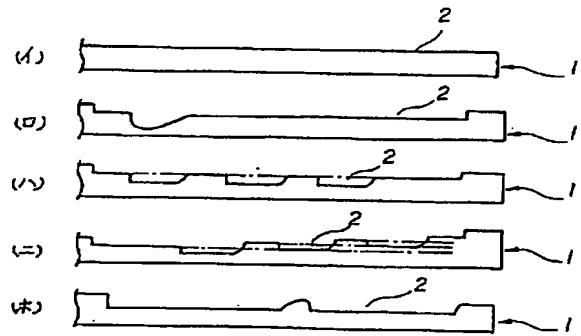
(1) 明細書第6頁最下行の「第3図(ホ)」を「第3図(イ)」に訂正する。

(2) 同第9頁13行目の「マイクロプローブ」を「ディスペンサー」に訂正する。

(3) 第3図を別紙の通りに訂正する。

(以上)

第3図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)